



TITLE:

細胞接着を介した外環境の機械的性質の感知と細胞間情報伝達機構の解明(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

日野, 直也

CITATION:

日野, 直也. 細胞接着を介した外環境の機械的性質の感知と細胞間情報伝達機構の解明. 京都大学, 2020, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22604>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2020-07-28に公開; 許諾条件により要旨は2020-05-31に公開; <https://jcs.biologists.org/content/132/2/jcs217349> DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.217349>, Naoya Hino, Leone Rossetti, Ariadna Marín-Llauradó, Kazuhiro Aoki, Xavier Trepas, Michiyuki Matsuda, Tsuyoshi Hirashima. ERK-mediated mechanochemical waves direct collective cell polarization. "Developmental Cell." 53, 646-660. (2020) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.011>

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	日野 直也
論文題目	細胞接着を介した外環境の機械的性質の感知と細胞間情報伝達機構の解明		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>細胞接着は多細胞生物において細胞の集団的な機能の実現に不可欠な要素である。細胞接着には細胞-細胞外基質（以下、ECM）間接着と細胞間接着の二種類があり、それぞれ組織の形態維持や物理的障壁の形成において重要な役割を担う。近年、細胞接着が接着構造にかかる張力などの機械的なシグナルの授受において重要な役割を果たすことが明らかになってきた。しかしながら、細胞による機械的シグナル感知機構や、機械的シグナルの細胞間情報伝達における役割については未だ明確になっていない部分が多い。</p> <p>第一章では細胞が ECM の硬さを感知する分子機構を解明することを目的とした。先行研究により、基質の硬さは細胞の分化、増殖、生存など多様な細胞機能を制御することが明らかにされている。硬い基質上では接着斑タンパク質であるビンキュリンがビネキシンαと相互作用することでオープン型へと構造変化し、アクチン線維との相互作用が促進されることで下流へのシグナル伝達が惹起される。しかし、ビネキシンαがビンキュリンの構造変化を引き起こすメカニズムは明確になっていない。そこで本研究ではビンキュリンとビネキシンの精製タンパク質を用いた相互作用解析と、培養細胞を用いた細胞生物学的解析を行い、ビネキシンαのビンキュリン相互作用機構とその意義について調べた。ビネキシンαのアミノ酸配列を用いて二次構造予測を行ったところ、N 末端側に両親媒性ヘリックスと予想される領域（以下、H2 領域）を持つことが分かった。精製タンパク質を用いた解析により、既知のビンキュリン相互作用領域である SH3 ドメインに加えて、この H2 領域もビネキシンαのビンキュリン相互作用領域であることを明らかにした。また、ビンキュリンの FRET バイオセンサーを用いた解析により、ビネキシンαの H2 領域破壊変異体は野生型と比較してビンキュリンの構造変化を引き起こす能力が低下することを明らかにした。ビネキシンαの H2 領域破壊変異体を発現した線維芽細胞では、野生型のビネキシンαを発現する細胞と比較して、硬い基質上でのビンキュリンのオープン型への構造変化が抑制され、さらに YAP/TAZ の核局在が減少した。以上のことから、ビネキシンαの両親媒性ヘリックスが新規ビンキュリン相互作用領域であることを発見し、この領域を介した相互作用が硬い基質上でのビンキュリンの構造変化とその下流での YAP/TAZ の活性化を促進することを明らかにした。</p> <p>第二章では集団遊走時の細胞間シグナル伝達における、細胞間接着にかかる張力の意義について解析を行った。上皮細胞は創傷治癒や発生過程において、細胞間接着を維持しながら、集団で一体となって運動する。こうした集団細胞遊走時に、MAP キナーゼ分子の一つである ERK の活性が遊走先頭の細胞から後方の細胞へと波のように繰り返して伝播することで、個々の細胞の運動方向がそろい、集団性の実現されることが明らかにされている。しかし、ERK 活性が細胞間を伝播する機構は明らかになっていない。本研究では、タンパク質キナーゼ分子の活性をモニターする FRET バイオセンサーを用いた生細胞イメージングや、光遺伝学技術を用いた分子活性操作を行うことにより、ERK 活性が細胞間接着に働く機械的なシグナルを介して伝播することを明らかにした。MDCK 細胞の生細胞イメージングにより、個々の細胞は伸展と収縮を繰り返しており、そうした変形が ERK 活性と同様に細胞間を伝播することが分かった。また、相互相関解析により、変形の波が ERK 活性伝播の波よりも先行すること、つまり細胞が伸展を始めた後に ERK が活性化し、その後細胞が収縮することを見出した。そこで次に、細胞の変形と ERK 活性変化との因果関係を解析した。細胞伸展装置を用いて細胞に伸展刺激をかけたところ、ERK 活性が上昇した。また、光遺伝学のツールを用いて ERK を活性化すると細胞が収縮することが分かった。これらの結果から、上皮細胞は細胞間接着を介して物理的に連結しているため、ERK 活性化依存的な細胞収縮は隣接細胞の伸展を引き起こし、隣接細胞での ERK 活性化、つまり ERK 活性伝播につながる可能性が考えられた。そこで、この仮説の検証のため、薬剤添加依存的に細胞収縮を惹起することができる FKBP-Rho GEF 系を用いた解析を行った。その結果、細胞収縮の誘導により、隣接細胞での ERK 活性化が引き起こされた。また、細胞間接着の構成因子であるα-カテニンを遺伝子欠損させた細胞では ERK 活性伝播が損なわれた。以上の結果から、ERK 活性伝播は細胞間接着を介して伝わる機械的なシグナルを介して伝播することが明らかになった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本学位論文は二章よりなる。前半部では細胞外基質の硬さ (Stiffness) が細胞接着斑の形成に及ぼす分子機構について解析し、後半部では細胞間の張力が細胞の収縮に及ぼす影響について解析している。

細胞接着斑は細胞膜貫通タンパク質であるインテグリンが集簇して細胞外基質に結合している部位である。インテグリンの細胞内ドメインにはタリンを介してビンキュリンが結合している。タリンおよびビンキュリンはアクチン線維を細胞膜に結合させる部位として機能する。このビンキュリンにはビネキシン α が結合し、ビンキュリンとタリンの結合を増強することが知られていた。申請者は、ビネキシン α の両親媒性ヘリックスが新規ビンキュリン相互作用領域であることを発見し、この領域を介した相互作用が硬い基質上でのビンキュリンの構造変化とその下流での YAP/TAZ の活性化を促進することを明らかにした。

一方、上皮細胞はカドヘリンを介して細胞間結合を行っている。申請者は細胞を物理的に伸展させる実験および、ケミカルバイオロジーの手法を用いて細胞を収縮させる実験を用いて、細胞への引張力の負荷が ERK MAP キナーゼの活性化を誘導することを見出した。さらに、光遺伝学ツールを使った ERK MAP キナーゼの活性化により、細胞の収縮が誘導されることも発見した。これらの知見をもとに、創傷治癒過程等における上皮細胞の集団移動のモデルを提唱した。すなわち、先導細胞から追従細胞へ引張力が負荷されることにより、追従細胞の ERK MAP キナーゼの活性化と追従細胞の収縮が誘導される。追従細胞の収縮は、細胞を前進させるとともに、さらに後方の追従細胞へ引張力を負荷することになる。この繰り返しにより、引張力ならびに ERK MAP キナーゼの活性化が先導細胞から後方の追従細胞へ伝搬され、細胞の集団運動をもたらす。

本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されており、細胞—細胞外基質および細胞間の張力が細胞を制御するメカニズムに関して、新たな生理学的知見を加えるものといえる。また、その内容は申請者の生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究能力を十分に示すものである。以上より、本論文を博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、令和 2 年 1 月 20 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 2020 年 5 月 31 日